



---

## **ACTA DE LA SESIÓN CONJUNTA CON EL INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN “SALVADOR ZUBIRÁN” DEL 14 DE OCTUBRE DE 2015**

**Estudio de las características fenotípicas y moleculares de Clostridium difficile en un hospital de tercer nivel.**

**Ponente: Dr. Luis Alfredo Ponce de León Garduño**

**Simposio:** Trabajo de Ingreso

**Coordinador:**

**Sesión:** Sesión Ordinaria

**Sede:** Auditorio de la Academia Nacional de Medicina

El Dr. Armando Mansilla pide al Dr. Luis Alfredo Ponce de León Garduño pase al estrado a presentar su trabajo de ingreso titulado “Estudio de las características fenotípicas y moleculares de Clostridium difficile en un hospital de tercer nivel.”

El Dr. Ponce de León agradece a todas las personas que participaron en este trabajo, desde pasantes y residentes hasta especialistas pero agradece de forma particular al Dr. Sifuentes que desde hace muchos años ha sido inventor y que en este trabajo en especial contribuyo de manera muy significativa, el Dr. comenta que en la actualidad Clostridium difficile se ha convertido en una de las causas más frecuentes de infección asociadas a los cuidados en México, sin embargo todavía es muy controversial el abordaje diagnóstico de esta infección, por una parte se puede diagnosticar y por otra intradiagnosticar y eso tiene mucho que ver con los costos hospitalarios, lo que sí se sabe es que la detección de la toxina es la que se asocia con un desenlace mucho más grave y esto es mucho más importante que solo demostrar con un cultivo la presencia del microorganismo.

Así lo que se pretende con este trabajo fue describir la epidemiología convencional y molecular de la enfermedad asociada Clostridium difficile en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” y para ello se escogió un periodo de estudio del 1° de junio del 2008 al 30 de septiembre del 2009, en donde sabíamos que estábamos en un canal endémico de infección asociada Clostridium difficile y de esta manera pudimos estudiar varias cosas, entre otras la si la presencia de la toxina o el cultivo realmente eran los que podían predecir el comportamiento clínico de la enfermedad y tratar de identificar algunas



características moleculares de este tipo de células, para esto definimos claramente diarrea, enfermedad asociada a *Clostridium difficile* y lo que era la colonización por *Clostridium difficile* y la enfermedad asociada a *Clostridium difficile* era la presencia de diarrea o de mega colón tóxico, pero además tenía que tener una prueba positiva para el germen o bien tener documentado histopatológicamente la enfermedad, mientras que la colonización por *Clostridium difficile* se trataba de un caso de infección que no produjera toxina, que esto era algo que nosotros queríamos investigar y que fue lo que hicimos, todas y cada una de las muestras diarreicas que se procesaron durante este período en el Instituto, se les hizo un estudio muy completo en el que identificamos o se intentó identificar la presencia de la toxina A/B *Clostridium difficile*, además de someterlas al cultivo y en aquellas que crecían a realizar pruebas de susceptibilidad antimicrobiana y extraer DNA, hacer las pruebas moleculares y la ribotificación para tratar de identificar con precisión si se encontraban sepas específicas dentro del Instituto y entre los más importante que se encontró fue:

- De las 1093 muestras que fueron enviadas al laboratorio para identificar agentes causales de diarrea en 115 de ellas encontramos oricultivo o una toxina positiva y esto es algo así como el 60% mediante la toxina y el 79% mediante cultivo y eso era lo relevante, 60% de estos 115 casos se determinaron con toxina y 80% con cultivo y quiere decir que detectamos mucho más fácilmente con cultivo la presencia del microorganismo, pero no necesariamente que esto fuera responsable de producir la enfermedad, de las 47 muestras que tenían cultivo positivo o una toxina negativa, sin embargo se encontró que el 62% provenía de pacientes que clínicamente o histopatológicamente tenían la enfermedad asociada a *Clostridium difficile* lo cual nos indica que el método de detección de toxina que nosotros estábamos utilizando no necesariamente es el ideal, sin embargo de las muestras con toxina positiva y cultivo negativo 86% si tenían la enfermedad asociada *Clostridium difficile* lo cual indica que los dos métodos son necesarios para hacer un diagnóstico complejo mucho más fácil, durante este período hubo 6590 infecciones en el Instituto y estos son exclusivamente las tazas de infección, como las podemos ver y esto era lo que se había observado en estudios previos, nada que se semejara a un brote y la tasa de infección asociada a *Clostridium difficile* era de 8.3 y se consideraba solamente la toxina y de 12.3 si se consideraba cultivo, y o toxina positiva y esto fue lo más relevante.

Otra de las cosas más relevante fue que algunos pacientes que tenían o habían llegado al Instituto con diarrea y que se les detecto *Clostridium difficile* en las heces se consideraba como un peligro de la comunidad, porque se presentaba en las



primeras 48 hrs. de su ingreso hospitalario lo que se observaba es que a diferencia de los que estaban asociados al cuidado de la salud que obviamente estos pacientes tenían mucho más estancia hospitalaria inclusive al momento de tomar la prueba de detección de la toxina, pero estos a su vez habían recibido más antibióticos y se habían expuesto a inhibidores de protones y habían estado expuestos a bloqueadores de H2.

Pudimos estudiar 80 sepas desde el punto de vista molecular absolutamente en todos los aspectos desde cultivo, toxina y lo que se observo es que 52% de estas 80 sepas no eran toxigénicas y esto es bastante interesante porque no siempre la ausencia de genes indica que no sean toxigenica, esto es muy relevante porque de todas maneras el que lo tengan presente no necesariamente quiere decir que vayan a producir toxina, puede estar presente el gen y no producir toxina y por lo tanto no ser responsable de la infección del cuadro clínico, en cambio las toxigenicas pues prácticamente el 90% tiene la presencia de los genes, pero aquí lo que es muy relevante es que se ha asociado con la presencia del gene tcdC como un factor hipervirulencia y de los que tienen este gene presente cuando hay una mutación una lesión de 18 pares de bases, en este gene es en el que se consideran la sepas todavía aún más hipervirulentas, es muy importante, como no se tenía ni una sola sepa resistente a metronidazol ni a vancomicina afortunadamente, pero si empezamos ya a tener problemas con resistencia a Clindamicina, 60% de estas sepas eran resistentes a Clindamicina y 20% eran resistentes a Moxifloxacino, tanto así que cuando consideramos la diferencia entre Clostridium difficile comunitario y el que estaba asociado a cuidados de la salud la diferencia más importante es que los que están asociados a cuidados de la salud son en general mucho más resistentes a Clindamicina que los que encontramos en la comunidad y también de una manera muy relevante, en este momento no hay una diferencia entre los Clostridium difficile aislados en la comunidad y los asociados al cuidado de la salud, cuando vemos la presencia o ausencia de mutaciones en el gene tcdC, en cambio cuando uno ve pacientes colonizados y pacientes con enfermedad es claro que la presencia de estos genes es mucho más frecuente en aquellos que tienen la enfermedad a diferencia de los colonizados respectivamente por que este es el factor precisamente de virulencia que estábamos buscando, no solamente cuando vimos los que tenían enfermedades asociadas a Clostridium difficile no grave, que estos son pacientes sin respuesta inflamatorio sin leucocitosis , sin fiebre, cuando se comparan con la enfermedad asociada a Clostridium difficile con megacolon toxico, pseudo membranas, gravedad, como fiebre y leucocitosis importante en los casos asociados a Clostridium difficile grave, vemos gérmenes mucho más resistentes a moxi y con mayor cantidad o mayor frecuencia de mutaciones en el en gen TCDC. Finalmente el Dr. Ponce de León concluye que esta es una parte muy interesante del estudio y presenta un análisis de todos los ribotipos de 67 de los aislados que lograron encontrar y caracterizar con esta técnica, como todo el mundo sabe la sepa que predomina es la 027, este es un ribotipo que se ha asociado mucho a hipervirulencia asociado más a megacolon toxico y muerte, sin embargo nosotros no encontramos una sola cepa con este ribotipo, sin embargo encontramos que el



90% de los aislados estaban en un conglomerado lo cual es muy relevante y quiere decir que son infecciones que se van transmitiendo dentro del hospital y también se encontró un subgrupo de pacientes muy hipervirulentos resistentes a moxifloxacino, resistentes a clindamicina que no eran lasb 01 pero que se comportaban como tal y eran exactamente idénticas y con esto se concluye que nuestros datos muestran una tasa de EACD dentro de los rangos observados en situaciones no epidémicas con una tasa baja de complicaciones, además observamos un grupo heterogéneo de cepas de *Clostridium difficile*, con algunos subgrupos endémicos lo que enfatiza la importancia de reforzar los programas de prevención y de control de infecciones dentro de un hospital, uno de estos subgrupos tuvo características moleculares y fenotípicas idénticas a la cepa NAP1/B1/027, pero con un ribotipo distinto.

El Dr. Ponce hace mención en particular de que fue lo más importante de este trabajo y enuncia lo siguiente:

- Aunque se observaron asociaciones entre algunas de las características de *Clostridium difficile* con desarrollo de enfermedad y gravedad, seguramente el curso clínico en el paciente es el resultado de la interacción de diversos factores del hospedero, algunas características de la bacteria y el ambiente hospitalario, por ello, resulta la necesidad de hacer diagnóstico oportuno de EACD complementando la determinación de toxina A/B con el cultivo para evitar la expansión de éste microorganismo que siga en expansión, muchas gracias.



---

## **Comentario al Trabajo de Ingreso**

**Ponente: Dr. Juan Calva Mercado**

**Simposio:** Trabajo de Ingreso

**Coordinador:**

**Sesión:** Sesión Ordinaria

**Sede:** Auditorio de la Academia Nacional de Medicina

El Dr. Mansilla pide al Dr. Juan Pablo Calva Mercado pase al estrado a discutir y dar su opinión sobre el trabajo de ingreso.

El Dr. Mercado agradece al Dr. Mancilla y comienza con el tema.

Las enfermedades infecciosas suelen mostrarnos facetas muy interesantes, y más que eso, apasionantes, y en esta ocasión me voy a referir a dos de estas facetas, una es la epidemiología de cada una de las enfermedades infecciosas “sue” y más para una enfermedad que es diferente según la región geográfica y la temporalidad, esto determinado en buena parte por la asombrosa plasticidad de los microorganismos y por las siempre cambiantes conductas humanas, la otra arista apasionante de las enfermedades infecciones es la creciente concepción de que estas son fenómenos más complejos de lo que se suponíamos, la idea de que la enfermedad no es más que la transmisión y adquisición de un germen patógeno es cada vez más obsoleta, ahora necesitamos superar esta visión simplista de la relación microbio humano, la enfermedad infecciosa en realidad es un accidente en donde se requiere además de la presencia del microorganismo la conjunción de varias circunstancias en las que los hospedero y el micro ambiente juegan un papel fundamental, el trabajo que nos acaba de mostrar el Dr. Alfredo Ponce de León es una pieza más de evidencia de que la colitis asociada a *Clostridium difficile* tiene distintas epidemiologías así como la complejidad de la patogenia de la enfermedad. En los primeros años del presente siglo se reportó una pandemia de infecciones por *Clostridium difficile* que inicio en los Estados Unidos y que pronto se diseminó a Canadá y Europa y llegó hasta Corea del Sur y Australia, lo alarmante de esta epidemia fue que la incidencia de infecciones por *Clostridium difficile* se duplicó y la mortalidad se incrementó 10 veces y lo interesante fue que este cambio epidemiológico se asoció a una transformación genotípica y fenotípica de la bacteria así la sepiidémica mostro ser única y se clasificó como un ribotipo 027 y diferente a las conocidas hasta entonces, es decir diferente a los aislamientos endémicos , lo diferente fue que esta sepa epidémica mostro ser más virulenta y con mayor capacidad de transmisibilidad, es decir se tornó una bacteria con mayor producción y potencia de las toxinas con más capacidad de esporulación, la producción de una



tercera toxina, la toxina binaria que se piensa que ayuda a la colonización intestinal y con mayor resistencia a los antibióticos y a los desinfectantes, de manera interesante en el estudio que acabamos de escuchar que fue realizado en pacientes atendidos en un Instituto Nacional de salud de la Ciudad de México ninguno de los aislamientos de Clostridium Difficile se identificó como perteneciente a esta cepa epidémica he hipervirulenta más aun la caracterización genotípica de la mayoría de los aislamientos reveló una diversidad de cepas y de linajes que apuntan a que al menos en este hospital y en la época del estudio las infecciones intestinales por Clostridium Difficile ocurrieron con un comportamiento endémico, tal parece que en nuestro medio no ha ocurrido una epidemia como la que ya mencioné en otras regiones del mundo, ¿ por qué nuestra epidemiología es diferente a la de los países altamente industrializados, ¿ es una pregunta por contestarse que nos deja el trabajo del Dr. Ponce de León, otro aspecto a resaltar de este estudio es el hallazgo de aislamientos de Clostridium difficile con los factores de virulencia que define a una cepa como hipervirulenta y sin embargo no pertenecieron a la cepa prototipo es decir al ribotipo 027 y esto nos lleva a replantar justamente la pertinencia de la definición de hipervirulencia basado únicamente en el estudio convencional de ribotificación, hay que buscar otros marcadores moleculares de hipervirulencia que nos resultan mas precisos y sobre todo útiles de la práctica clínica pasando a otra arista la nueva concepción es que la infección por Clostridium Difficile es tan solo el final de una cadena de eventos en realidad inicia con la ruptura de la llamada “resistencia a la colonización” es decir ahora entendemos que la microbiota nativa intestinal es un mecanismo de homeostasis al impedir la colonización y el crecimiento de microbios patógenos en el tubo digestivo como es el caso de Clostridium difficile así tal parece que el futuro de la prevención y el tratamiento de la colitis por este germen incluirá intervenciones encaminadas a la reestructuración y el buen funcionamiento del microbioma humano, como buen trabajo científico el del Dr. Ponce de León no solo contesta preguntas si no que apunta hacia nuevas rutas de investigación a seguir, nuevas venidas como el estudio del microbioma y del metaboloma gastrointestinal para el mejor entendimiento de los mecanismos de daño en esta peligrosa danza entre el microbio y el ser humano. Muchas gracias.



---

## **Introducción**

**Ponente: Dr. Gerardo Gamba Ayala**

**Simposio:** Nuevos valores e investigación en el INCMNSZ

**Coordinador: Dr. Gerardo Gamba Ayala**

**Sesión:** Sesión Conjunta con el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

**Sede:** Auditorio de la Academia Nacional de Medicina

El Dr. Mansilla pide al Dr. Gerardo Gamboa Ayala coordine la sesión conjunta.

El Dr. Gamboa agradece a la ANM por mantener esta sesión conjunta con el Instituto de Nutrición.

El Dr. Gamboa refiere que quiso utilizar el tiempo para presentar nuevas líneas y sobre todo nuevos valores de investigación que se tienen en el Instituto, a continuación tendremos cinco diferentes presentaciones impartidas por diferentes investigadores del Instituto como primer lugar tenemos al Dr. Alfredo Ulloa quien presentará sobre el tema de la red de apoyo a la Investigación, después tenemos una heterogeneidad de trabajo donde el Dr. Cripsin hablará sobre la expresión deficiente de esta proteína en la generación de Lupus Eritematoso generalizado, la Dra. Lilia Noriega del departamento de fisiología de la Nutrición, hablará sobre un nuevo grupo de proteínas de interés creciente que se llaman sirtuinas, posteriormente el Dr. Chiquete hablará sobre los trabajos que ha venido haciendo en el departamento de Neurología sobre la enfermedad neurovascular y al final la Dra. María Castañeda nos hablará sobre un aspecto molecular que tiene que ver con la generación de la hipertensión arterial.

El Dr. Gamboa resalta lo nuevos investigadores que tiene el Instituto y resalta el alto nivel de preparación de los investigadores que están llegando a la Institución con la intención principalmente de que la gente joven que está aquí y en línea vea el nivel de preparación que se está teniendo hoy en día para lograr instalarse como un investigador en Instituciones como los Institutos Nacionales de Salud.

El Dr. Gerardo Gamboa presenta a todos los ponentes, no presenta al Dr. Ulloa ya que él no es un nuevo valor más que eso es un Investigador ampliamente conocido y reconocido tanto a nivel nacional como a nivel internacional, el Dr. José Carlos Crispín que es miembro del nivel III del SIN, él estudio medicina y después realizó una residencia de MI y reumatología en el Instituto, al mismo tiempo realizó el doctorado en Ciencias Biomédicas y se fue algunos años a la Universidad de Harvard en el Hospital Beth Israel para realizar un pos doctorado, la Dra. Lilia Guadalupe Noriega es química farmacobióloga de la universidad de San Luis Potosí, realizó un doctorado en Biomedicina molecular en el CINVESTAV y después



se fue varios años a Europa en donde realizó dos pos doctorados, el Dr. Erwin Chiquete es médico cirujano por la Universidad de Guadalajara y el empezó sus posgrados de la manera inversa, primero hizo un doctorado en biología molecular en medicina ahí en la universidad de Guadalajara, después hizo la residencia en MI en la misma universidad y posteriormente fue al Instituto de Nutrición para realizar la especialidad de Neurología Clínica, finalmente la Dra. María Castañeda ella es Lic. En investigación biomédica básica del Instituto de Investigaciones biomédicas de la UNAM, al término de su licenciatura realizó un doctorado en ciencias bioquímicas también en la UNAM y posteriormente estuvo un par de años en el departamento de genética de Yale en la escuela de medicina y recién llegó a incorporarse al instituto como investigadora, ellos son investigadores jóvenes con gran nivel de preparación que podrán concertar en el momento en que vean el nivel de trabajo que les van a presentar.

## **La red de apoyo a la investigación**

**Ponente: Dr. Alfredo Ulloa Aguirre**

**Simposio:** Nuevos valores e investigación en el INCMNSZ

**Coordinador: Dr. Gerardo Gamba Ayala**

**Sesión:** Sesión Conjunta con el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

**Sede:** Auditorio de la Academia Nacional de Medicina

El Dr. Ulloa agradece al Dr. Gamboa por la invitación, gracias por darme estos minutos para comentarles de algo muy novedoso que se llama red de apoyo a la investigación y que es un proyecto muy ambicioso de reciente creación, la red de apoyo a la investigación, es un espacio de servicio de alta tecnología y de investigación multidisciplinaria y tiene como objetivos el ofrecer servicios de procesamiento de muestras de asesoría en alta tecnología y estadística y bioinformática a investigadores clínicos y a investigadores biomédicos a promover y desarrollar investigación en multidisciplinaria en biomédica y clínica, facilitar la interacción entre los investigadores que pertenecen al consorcio red de apoyo a la investigación así como formar recursos humanos en el manejo de la tecnología de alta tecnología.





## ¿Qué instituciones conforman la RAI?

Pues el Instituto Nacional de Ciencias Médicas, el Instituto Nacional de Medicina Genómica, la Universidad Nacional Autónoma de México a través de la coordinación de la Investigación Científica y de todo lo que representa al Subsistema de la Coordinación de la Investigación Científica, el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez y el Instituto Nacional de Cancerología, todas estas Instituciones forma el consorcio que se llama red de apoyo a la Investigación, la UNAM es parte medular en este consorcio y que es la responsable de proveer a los investigadores y a los técnicos académicos que manejan la red de apoyo incluyendo el Director Científico en esta participan también los institutos del consorcio en proveer de investigadores, comisionados altamente calificados a la red, y pues los laboratorios que componen la red de apoyo a la investigación la RAI está ubicada en el segundo piso del edificio de radio-oncología de INCMNSZ, tiene una superficie de 650 m<sup>2</sup>, está constituido por 7 laboratorios y unidades, un laboratorio de Investigación y un área administrativa que alberga a los investigadores y a los técnicos académicos y estudiantes que trabajamos aquí, se muestra un plano de lo que es la RAI, en la parte inferior esta genómica, laboratorio de cultivo celular, laboratorio de biología molecular, la estación robotizada, el área de centrifugas, citometría de flujo y proteómica, la parte de administración y siguiendo de arriba tenemos el cuarto de congeladores, microscopia y finalmente el laboratorio abierto, la inversión total aproximadamente es de \$140,000,000.00 de pesos que fueron otorgados por diferentes fundaciones incluyendo la Fundación Río Arronte, BANAMEX, Seguro Popular, etc. Para proveer el equipo que se ve que está compuesto por diferentes plataformas incluyendo la plataforma ilumina para los equipos de secuenciación de una nueva generación la plataforma Applied Biosystems para biología molecular y secuenciación capilar, la parte de microscopia que es con excepción de doce microscopios de epifluorescencia marca Leica es Zeiss y esta parte de microscopia que es bastante robusta, el equipo se encuentra en el Instituto Nacional de Cancerología que es parte del consorcio de la red de apoyo a la Investigación, tenemos diferentes plataformas en proteómica entre las que se encuentran Agilent para el espectrómetro de masas líquido que estamos instalando en el segundo piso de la red de apoyo y el 3er piso del edificio de radioncología, proteómica también incluye un equipo maravilloso de resonancia y Plasmón de superficie que es el Biacore T200, en pocas palabras esta es una súper unidad que provee servicios de alta tecnología y que permite dar ese brinco a las omics que tanto nos hace falta en México y que ya es parte prácticamente de la Investigación biomédica y clínica contemporánea, actualmente quien constituye el personal son 15 miembro del staff, que son investigadores de tiempo completo de la universidad, técnicos, académicos y dos investigadoras que están comisionadas, una genomista y una inmunóloga. Les voy a describir el menú de servicios y lo que hacen al menos tres de los laboratorios de la red.

El servicio de genómica que tiene plataforma ilumina, un equipo de HiSeq 2500 y un Miseq, es el último grito de la moda en secuenciación de nueva generación,



además de equipo chico preparativo que es necesario para hacer una serie de estudios que incluyen obviamente genoma completo, exoma, transcriptoma, prácticamente se hacen el menú de los servicios que se hacen en nueva generación son los menos que encontramos en cualquier parte del mundo que tiene este equipo, no hacemos micro arreglos porque un socio del consorcio que es el Instituto de Medicina Genómica tiene el equipo de micro arreglos, muy ligado al laboratorio de genómica, está el laboratorio de Bioinformática, la Unidad de Bioestadística y Biología computacional que hace toda esta serie de exámenes de los datos que provienen del laboratorio de genómica pero ya próximamente en el año que entra del laboratorio de proteómica particularmente del espectómetro de masas líquido contamos con gente entrenada en bioinformática que hace los análisis primarios como parte de los estudios de genómica y además si se requiere de otro tipo de análisis también los pueden llevar a cabo, ellos y la reciente incorporación de una gente que se dedica exclusivamente a biología de sistemas que esta comisionado por la RAI en el Instituto de Medicina Genómica, la Unidad de Metabólica y proteómica en donde uno de los equipos de los cuales estamos muy orgullosos y que se está ya empezando a hacer uso de estos hay pocos equipos en México debe haber 3 plasmones de superficie al igual que el Hi Seq 2500, hay únicamente 3 equipos en México, este es un equipo maravilloso que permite estudiar interacción proteína-proteína y obtener una serie de parámetros esenciales para los que estudian, por ejemplo, especificidad de anticuerpos monoclonales, glicosilación de proteínas, etc. Y parte del equipo que es el cromatógrafo de gases con su espectro de masas y además el espectómetro de masas líquido que como les comente se obtuvo a través del financiamiento de la infraestructura del consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y estos son los procedimientos que pueden hacerse en el laboratorio de proteómica, en fin ha sido una presentación breve, esta red espero que les ayude a las compañías externas no solo a las de iniciativa privada sino también a agencias financiadoras para que tengamos un ahorro considerable en inversión de recursos, un solo secuenciador de nueva generación del HiSeq 2500, su costo al precio del dólar actual es mayor a 15 millones de pesos, el del espectómetro de masa es de aproximadamente 12 millones de pesos, en fin esto va a redituar en un ahorro para compañías y agencias financiadoras y además le va a dar al Investigador la oportunidad de a muy bajos precios hacer trabajos de investigación, de alta calidad y alta trascendencia, finalmente es importante mencionar que la red de apoyo a la Investigación es parte del programa especial de apoyo a la Investigación y a la docencia de la coordinación de la Investigación científica a la cual también pertenece el nuevo centro de genómica que está en Juriquilla.



---

## **La expresión deficiente de B55-beta promueve el desarrollo de Lupus Eritematoso Generalizado**

**Ponente:** Dr. José Carlos Crispín

**Simposio:** Nuevos valores e investigación en el INCMNSZ

**Coordinador:** Dr. Gerardo Gamba Ayala

**Sesión:** Sesión Conjunta con el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

**Sede:** Auditorio de la Academia Nacional de Medicina

El Dr. Crispin agradece al Dr. Gamboa por la oportunidad de presentar su trabajo.

El Dr. Crispin habla de un proyecto que tiene en su laboratorio y que se centra en el estudio de una fosfatasa de serinatreonina que se llama PP2A, PP2A es una fosfatasa muy importante y muy bien conservada durante la evolución que está involucrada en una gran cantidad de procesos celulares fundamentales, como Apoptosis ciclo celular, vías de señalización y metabolismo, entonces como es posible que una fosfatasa se encargue de tantos procesos diferentes, eso explica por qué la fosfatasa PP2A como algunas otras de las fosfatasas de serinatreonina está formada por 3 unidades de las cuales dos de ellas que es la subunidad estructural y la subunidad catalítica son dos proteínas muy bien conservadas que están presentes en todas las células pero para que funcione como una oloenzima se acoplan a este heterodimero, una tercera proteína de la cual existen muchas isoformas mas de 25, esta tercera proteína se llama subunidad reguladora y es de la que vamos a hablar.

Al laboratorio le intereso trabajar con PP2A porque existen reportes que ligan alteraciones en PP2A, alteraciones en su expresión y en su función a la presencia de enfermedad autoinmune, en particular de lupus y hemos tenido o se han publicado artículos donde se ha demostrado que la modulación en la expresión de PP2A en modelos murinos también causa alteraciones inmunológicas, entonces con esto en mente y tomando en cuenta que para entender la función PP2A es fundamental entender cuál es la subunidad reguladora que está asociada al efecto biológico que se está viendo, se hizo un tamizaje en células T de pacientes con lupus con el fin de ver si alguna de las isoformas reguladoras mostraba defectos en la expresión y encontramos que esta subunidad B55 beta se expresaba ligeramente menos en células T de pacientes con lupus tenía una disminución de aproximadamente 40% en su expresión en ese momento no se sabía cuál era la



función de esta proteína, el gen que la codifica se había asociado a esta enfermedad neurodegenerativa y entonces nos propusimos la tarea de investigar cual era la función en células T y también de investigar si tenía alguna relación con la enfermedad con lupus, todos los datos que se van a presentar son hechos en células humanas, en células TA activadas, la expresión de PP2A es baja pero que se incrementa rápidamente cuando las células T se les quita interleucina 2 que es un factor de crecimientos muy importante, esto de quitar la IL2 tiene como consecuencia en células TA activadas que las células que desencadena apoptosis pero otros estímulos que causan apoptosis por ejemplo el uso de anticuerpos agonistas contra las que no tenían ningún efecto en PP2A.

Lo que se encontró que las células recibían el transgen, estas células rápidamente se desencadenaba apoptosis en ellas, entonces encontramos que teníamos una proteína que se inducía en células T cuando los niveles de IL2 disminuían y que en su expresión forzada inducía a apoptosis lo cual hacía la hipótesis obvia de que quizá esta proteína estaba involucrada en que las células T detectarían los niveles bajos de la IL2 y este fuera el desencadenante de apoptosis en ese contexto y eso es muy importante porque el sistema inmune adaptativo de la manera en la que funciona es que cuando existe estímulo los clones de linfocitos que son específicas se expanden de una manera muy grande pero después se tienen que contraer otra vez al término de esa respuesta inmune y esta contracción es lo que permite que la respuesta inmune termine y lo que evita que haya patología asociada al sistema inmune y esta contracción se sabe que depende de que disminuya la abundancia de IL2 y de otra citosinas, entonces se hizo la hipótesis de que los defectos en la inducción de B55 podrían contribuir a la patogénesis de enfermedades autoinmunes como lupus.

El Dr. Crispin muestra una diapositiva de la manera en que se tomaban células T aisladas en pacientes o de controles y se expandían durante 10 días al cabo de los cuales se les quitaba IL2 y se analizaba apoptosis, cuando se hacía esto en células T de sujetos sanos rápidamente las células y de una manera homogénea morían por apoptosis y cuando se hacía en pacientes con lupus se notó que algunos de los pacientes sus células tenían una cinética normal de inducción de apoptosis, mientras que otros mostraban resistencia, lo que fue muy interesante aquí fue que a excepción de este paciente las células de los demás pacientes que tenían un fenotipo resistente no inducían B55 cuando les quitábamos IL2 y esto parecía ser un defecto específico asociado a la privación de IL2 porque cuando iniciamos apoptosis con FAS la cinética y la magnitud de la apoptosis era la misma en pacientes sin control, entonces pues era muy interesante y queríamos saber cómo era que B55 inducía apoptosis, entonces después de estudiar muchas vías de señalización nos dimos cuenta que las células T activadas tienen altos niveles de defosfolidación de esta equinaza que se llama AKT y que es una equinasa muy importante para la supervivencia celular pero que tras la privación de IL2 la equinaza AKT se desfosforila completamente después de un retraso, esto no se



observa inmediatamente sino que se observa a partir de las cuatro horas y esta cinética parece corresponder con la cinética de expresión de B55, entonces dado que B55 es una fosfatasa o una molécula reguladora de una fosfatasa quisimos demostrar si acaso esta fosfatasa era la desfosforilaba AKt, entonces hicimos el mismo experimento pero infectamos a las células con el antiviral que disminuía la expresión de B55 y lo que notamos fue que a diferencia de las células normales infectadas con lentivirus se encontró que después de retirarles IL2 disminuían la fosforilación de AKt, aquellas que estaban infectadas con un lentivirus que disminuían la expresión de B55, la fosforilación no disminuía esto es que las células T que estaban activadas resistían a la privación de IL2 y morían menos por apoptosis y AKt se desfosforilaba menos.

En resumen la IL2 es una citosina muy importante para que las células T detecten el ambiente en el que viven y cuando el tanque de IL2 está lleno pues las células tienen todo para seguir activas y sobrevivir, pero cuando la abundancia de IL2 disminuye se induce B55 y esto tiene como consecuencia la desfosforilación de AKt y la apoptosis, entonces esto es muy importante porque este ciclo del sistema inmune quiescente a expansión clonal, al sistema inmune quiescente otra vez parece depender de B55beta porque parece que esta molécula es el sensor de la escasez de citosinas que desencadena la apoptosis.

El Dr. Crispín agradece a la gente que colaboró con él en este proyecto y a todas las agencias que los han apoyado incluyendo a CONACYT y a Nutrición que nos han dado muy buena respuesta aquí en México.



---

Las sirtuinas como potenciales blancos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades crónico degenerativas

**Ponente:** [Dra. Lilia Noriega](#)

**Simposio:** Nuevos valores e investigación en el INCMNSZ

**Coordinador:** [Dr. Gerardo Gamba Ayala](#)

**Sesión:** Sesión Conjunta con el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

**Sede:** Auditorio de la Academia Nacional de Medicina

La Dra. Noriega agradece por la invitación y comenta que en el departamento de fisiología de la Nutrición se han estudiado a los compuestos bioactivos como una estrategia para el control de enfermedades asociadas con la nutrición como la obesidad, la diabetes, enfermedades cardiovasculares como son las saponinas del agave, la genisteína de la soya y el resveratrol presente en la piel de las uvas que son el vino tinto, además esto ha permitido establecer mecanismos moleculares que se encuentran alterados durante estas enfermedades en el caso del resveratrol se ha establecido como esta molécula a través de AMPK y SIRT1 regula la biogénesis mitocondrial, la homeostasis de glucosa y lípidos y también presenta algunas actividades antitumorales.

A propósito en esta plática me voy a enfocar en SIRT1 que es un miembro de una familia de proteínas conocida como sirtuinas las cuales regulan la actividad de enzimas, factores de transcripción e histonas a través de la desacetilación, esta reacción es la remoción del grupo acetilo unido a la lisina de la proteína sustrato al NAD, formando la proteína desacetilada la acetil-ADP-ribosa y nicotinamida, además de la acetilación ahora se sabe que también llevan a cabo otra reacción, esta familia tiene siete miembros que van desde SIRT 1 hasta SIRT7 que varían dependiendo de su localización intracelular, tenemos unas en citoplasma otras mitocondriales y algunas en el núcleo, algunas de ellas sólo llevan a cabo una reacción y hay otras como el Caso de SIRT5 que llevan a cabo varias de estas reacciones en base a las proteínas que regulan, tenemos su posible utilidad terapéutica SIRT1 ha sido la más estudiada y por ejemplo a través de la regulación de P53, puede utilizarse como en el tratamiento del cáncer, sin embargo también hay muy poca información al respecto de algunas de ellas como es el caso de SIRT6 y SIRT7, ampliar el conocimiento de las sirtuinas nos va a permitir expandir su utilidad en el tratamiento de enfermedades en el departamento, hemos estudiado a las sirtuinas abordando dos aspectos, el primero es como se regula la expresión



y la actividad de ella y el otro cuales son las proteínas blanco y los procesos que regulan , hasta ahora hemos estudiado como se regula la expresión de SIRT1 y teníamos evidencia que la expresión de SIRT1 aumentaba durante el ayuno en varios tejidos y un análisis del promotor de esta proteína mostró elementos de respuesta al factor de transcripción CREB, interesantemente cuando cotrafectamos el promotor SIRT1 con este factor de transcripción vemos como se aumenta la actividad del promotor y cuando detectamos los elementos de respuesta pues la actividad se pierde y los elementos relevantes para esta regulación son el 2 y el 4 ya que cuando los mutamos específicamente pues se pierde la inducción por CREB, in vivo utilizando un adenovirus con una dominante negativo de CREB vemos como la inducción que normalmente ejerce el ayuno se ve abatida.

Por el contrario cuando hay disponibilidad de nutrimentos como es el caso de después de alimentarse la expresión de SIRT 1 disminuye importantemente en el hígado y uno de los factores de transcripción que está involucrado en la respuesta cuando hay nutrimentos disponibles es CHREBP y cuando cotrafectamos el promotor de SIRT1 y con este factor de transcripción vemos como la actividad del promotor disminuye y cuando eliminamos el elemento de respuesta la disminución se ve abatida cuando bloqueamos la actividad de CHREBP utilizando una RNA de transferencia o en ratones deficientes de CHREBP podemos observar como la expresión de SIRT1 se restablece, esto nos permitió publicar un artículo en el que demostramos como la expresión de SIRT1 regula por disponibilidad de nutrimentos a través de CHREB inhibe su expresión.

Con respecto al otro aspecto hemos estudiado cuales son las proteínas blancas de regulación de SIRT7, para ellos hemos utilizado una base de datos que se llama genenetwork que fue generada con ayuda de una población de referencia genética, esta población de referencia genética es un conjunto de cepas que se generaron a partir de la cruce de dos cepas completamente diferentes como son la C57BL6 Y DBA lo cual genero una heterogeneidad genética similar a la que existe en una población humana y así de manera natural tenemos cepas que expresan niveles muy bajos de ciertos transcritos y cepas que expresan niveles elevados de ciertos transcritos, de cada una de estas cepas se colectaron tejidos y se hicieron micro arreglos y se generó la base de datos, en esta base de datos analizamos los transcritos que se relaciona con el transcrito de SIRT7, encontramos que en segundo lugar se encuentra el cotransportador SLC12a7, que transporta potasio y cloro y es conocido como KCC4, KCC4 ha sido ampliamente estudiado por el grupo del Dr. Gerardo Gamba y se sabe que regula la salida de estos dos iones permitiendo la reabsorción de sales pero además modula la secreción de protones manteniendo el balance ácido base, la correlación que observamos entre SIRT7 Y KCC4 sugería que pudiera haber alguna implicación funcional, para ello lo primero que evaluamos es determinar si KCC4 podría ser acetilada, cuando incubamos ovocitos inyectados con KCC4 observamos que en presencia de un inhibidor de acetilasas KCC4 se acetila importantemente y esto está asociado con una



disminución en la cantidad de proteína y una disminución en su actividad, cuando ponemos y sobre expresamos SIRT7 en este contexto podemos ver como el sobre expresar SIRT7 aumenta la actividad de KCC4 y esto está asociado con una mayor cantidad de proteína en KCC4.

KCC4 se regula por la disminución de PH, aquí podemos ver como cuando se disminuye el PH aumenta la actividad de KCC4 y cuando sobre expresamos SIRT7 interesantemente la actividad de KCC4 aumenta independientemente del PH, nosotros quisimos evaluar si la regulación de PH estaba involucrado SIRT7 y para ello inhibimos la actividad de SIRT7 con ayuda de un ..... y podemos observar cuando no está presente SIRT7 la actividad de KCC4 se bloquea y esto está asociado con una disminución de la proteína, ahora como una proteína que está en el núcleo como es el SIRT7 puede regular a una proteína que está en membrana como es KCC4, interesantemente estas inmunoflorescencias demuestran que en condiciones normales SIRT7 está presente en el núcleo pero ante un estrés como es el de la acidosis SIRT7 migra y lo podemos encontrar en las membranas, adicionalmente en ratones deficientes de SIRT7 muestran una disminución en los niveles de KCC4 y una alteración en los niveles de los electrolitos urinarios, esto nos ayuda a poner en contexto a SIRT7 en el que ahora sabemos que durante estrés como es la acidosis metabólica SIRT7 sale del núcleo a la membrana para desacetilar KCC4 y con ello modular la secreción de protones y así la acidosis metabólica, alguno de los otros cotransportadores que observamos que relacionaba con SIRT7 encontramos al de ácidos biliares y sodio llamada NTCP1, este transportador también se encuentra aumentado en el hígado de ratones deficientes de SIRT7, lo que quiere decir que SIRT7 puede estar implicado en la regulación de NTCP1, además de NTCP1 se sabe que se aumenta en el hígado de ratones hembra y curiosamente SIRT7 combate esta misma regulación ya que aumenta en el hígado de los ratones hembra al igual que NTCP1, esto nos ha permitido generar nuevas preguntas de investigación en las que nos encontramos trabajando actualmente como cuál es el papel de SIRT7 en la homeostasis de los ácidos biliares que tiene una gran relevancia ya que con ello podría regular el metabolismo del colesterol y el gasto energético, además de que nos ayuda también a plantear una hipótesis de cómo se regula la expresión de SIRT7 y esto podría ser a través del receptor de estrógenos, apoyamos esta hipótesis en un análisis del promotor ..... y encontramos que existen elementos de respuesta al receptor de estrógenos, tanto en el promotor en humanos como en ratones y en ratas.

La Dra. Noriega agradece a todos los que han participado en el desarrollo de estos proyectos y a nuestros colaboradores en Suiza y al financiamiento del CONACYT.





---

## **Composición corporal y riesgo de enfermedad neurovascular**

**Ponente:** Dr. Erwin Chiquete

**Simposio:** Nuevos valores e investigación en el INCMNSZ

**Coordinador:** Dr. Gerardo Gamba Ayala

**Sesión:** Sesión Conjunta con el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

**Sede:** Auditorio de la Academia Nacional de Medicina

El Dr. Chiquete agradece la invitación a la plática.

Después de hacer una breve introducción vamos a hablar sobre los índices tradicionales, luego los emergentes y algunas de las direcciones futuras que hemos estado tomando ya en el departamento para esto.

Como sabemos la obesidad desde el punto de vista fisiopatológico se define como el exceso de grasa corporal y aunque existen diferentes métodos alguno más precisos que otros para determinar este exceso de adiposidad en la práctica clínica en realidad usamos métodos antropométricos indirectos de la grasa abdominal, la grasa visceral probablemente sea la más relacionada con los efectos deletéreos de esta acumulación de adiposidad debido a mediadores pro inflamatorios, algunos de ellos que originan o precipitan la tero trombosis y algunas otras consecuencias metabólicas, esta grasa visceral la podemos medir de diferentes formas algunas de ellas indirectas como es mediante la imagenología por resonancia magnética en la que se puede semicuantitativamente determinar el contenido de la grasa abdominal y con ello relacionarlo con diferente desenlaces cardiovasculares o biomarcadores, el exceso de grasa visceral se ha relacionado con presión arterial sistólica elevada, presión arterial diastólica elevada y glucemia.

Por supuesto actualmente el índice de masa corporal es el indicador antropométrico de adiposidad general que no precisamente adiposidad regional que más se usa en clínica, sin embargo según lo propusiera el matemático Belga Adolphe Quételet en 1832, en realidad el índice de masa corporal establece que la masa corporal se incrementa proporcionalmente con la estatura en metros, Quételet solo quería determinar que matemáticamente había una relación entre la talla al cuadrado y la masa corporal total, el índice de masa corporal como sabemos presenta un patrón de riesgo en "J" con respecto a diferentes desenlaces, entre ellos la mortalidad por



cualquier causa, de tal forma que un índice de masa corporal disminuido o uno excesivo aumenta el riesgo de muerte o algunos desenlaces cardiovasculares, esto se ha podido determinar en diferentes poblaciones, incluyendo la población caucásica y consorcios han podido determinar que esto también es cierto en diferentes grupos bioétnicos, por supuesto el exceso de adiposidad viene de un balance energético positivo en el que el ingreso de energía básicamente ocurre por alimentación, el egreso o el gasto energético total debido al gasto energético que se utiliza para la alimentación que es para la energía que se utiliza para poder absorber, asimilar, metabolizar los nutrimentos, el gasto energético basal establece la función, digamos normal en reposo del individuo y el gasto energético derivado de la actividad física que puede ser alrededor del 25% o hasta el 50% en deportistas de alto rendimiento.

El balance energético positivo nos va a dar como consecuencia este exceso de adiposidad y estos adipocitos cuando están hipertrofiados o con hiperplasia presentan un aumento en la secreción de mediadores inflamatorios que lo que van a hacer es a precipitar diversas consecuencias metabólicas entre ellas la propia hater trombosis, sin embargo el viejo esquema de que el adipocito como órgano endocrino secreta solo mediadores que le son perjudiciales al cuerpo, pue no es cierto, el adipocito puede secretar mediadores que le son benéficos incluso a la arteria como es la adiponectina pero el secreto está en que este adipocito secreta estos mediadores, cuando es pequeño no cuando esta hipertrofiado, estas consecuencia tanto de estos mediadores pro inflamatorios como estos mediadores benéficos para el cuerpo también se pueden manifestar en la forma de resistencia a la insulina o una sensibilidad a la insulina digamos normal, cuando el adipocito es pequeño sin embargo el índice de masa corporal como un indicador de adiposidad no es perfecto es decir el IMC es un indicador más de masa total que de adiposidad, de tal forma que dos individuos con mismo peso y talla pero diferente composición corporal verificable con densitometría presentan diferente composición corporal aunque el mismo índice de masa corporal, el IMC sin embargo a nivel poblacional es un marcador más o menos útil porque la mayoría de las personas que aumentamos de peso pues lo hacemos a expensas de adiposidad y no tanto de masa muscular por eso bastante adecuado cuando hablamos de poblaciones pero no paciente por paciente y otro de los problemas que tiene el índice de masa corporal es que presenta una supuesta paradoja de la obesidad que es más una paradoja del IMC por no entender adecuadamente que es lo que expresa el IMC , que expresa que el índice de masa corporal elevado aumenta el riesgo de ciertas enfermedades entre ellas la enfermedad renal crónica, la enfermedad coronaria, la enfermedad cerebro/vascular y otras insuficiencias orgánicas pero que cuando una persona ya ha adquirido esta enfermedad tiene mayor probabilidad de subsistir si tiene un IMC alto a esto le han llamado la paradoja de la obesidad y ha sido peligrosamente mal interpretado como un efecto protector de la obesidad que no es tal, de tal forma que por ejemplo en este caso pacientes que han sobrevivido a un infarto del miocardio tienen mayores probabilidades de subsistir al año que le sigue



, si el índice de masa corporal es elevado y no así si es disminuido, sin embargo vamos a ver más adelante, nosotros hemos podido determinar en el Instituto que no se trata de la adiposidad si no de la masa magra que compone al propio IMC de acuerdo a índices nuevos que hemos nosotros podido determinar en un análisis mexicano en el que participamos con pacientes con fibrilación auricular pudimos determinar que efectivamente hay una aparente paradoja del IMC elevado en el que los pacientes con un IMC mayor a 27 tienen mayores probabilidades de subsistir si sobreviven a una fibrilación auricular y durante el siguiente año tienen una ventaja aparentemente de supervivencia, incluso si nosotros ajustamos por variables de bastante peso como la estenosis carotídea, la enfermedad renal crónica o el modo de tratar la frecuencia, la fibrilación auricular en estos pacientes aun ajustando por variables de peso parece ser que el IMC mayor a 27 es protector por eso por supuesto chocaba con nuestra ideología de que la obesidad es nociva y por qué entonces aquí resulta que aparentemente había un efecto protector, por supuesto no es la obesidad es el IMC elevado, pero entonces realmente es el IMC el único índice de adiposidad sencillo que puede ser usado a nivel clínico y epidemiológico o que otras evidencias existen en mexicanos y que alternativas antropométricas podemos tener, uno de ellos muy importante es el perímetro abdominal que de alguna manera indirectamente expresa la cantidad de grasa abdominal, subcutánea y visceral que tienen los individuos y esta puede ser corregida un poco por la talla, no es lo mismo un perímetro abdominal de 90 cm de una persona que mide 1.60 a una que mide 1.80 o 2 metros x que sencillamente el perímetro abdominal es el que tiende a cambiar con la edad y no la talla, después de alcanzar la etapa adulta por lo tanto nosotros tratamos de probar el índice cintura talla para determinar cuál es la probabilidad de subsistencia en las personas que sobreviven a un primer infarto cerebral en su vida y en un año encontramos un patrón de riesgo en “U” donde el índice cintura talla bajo o muy elevado se asocia a una mayor probabilidad de morir después de un infarto cerebral, entonces aquí aparentemente estábamos equivocados pensando que efectivamente que el índice cintura talla mide adecuadamente adiposidad entonces también cierto grado de adiposidad es protector siempre y cuando este no sea excesivo, en este análisis factorial podemos ver como cuando conjuntamos a los pacientes con un índice cintura talla o muy pequeño o muy alto la probabilidad de subsistir disminuye con respecto a las personas que tienen un índice cintura talla digamos normal, que no normalidad estadística algunos índices emergentes que han sido derivados tanto para la predicción de adiposidad como para la distinción de la contribución de la masa grasa con la masa magra son los siguientes:

Índice de adiposidad: este índice es bastante simple lo único que necesitamos es el peso y la talla y con ellos es posible determinar la grasa corporal que tiene un individuo por ejemplo con casi un estándar de oro que es la densitometría, este mismo índice ya ha sido validado en otras poblaciones de manera interesante y nosotros lo hemos estado probando con nuestras bases de datos de pacientes con infarto cerebral a nivel Latinoamérica, el Instituto como tal es líder en este sentido a



nivel Latinoamérica en diferentes consorcios de Investigación que estamos realizando sin embargo nuestras propuestas son que no tenemos un índice que mida la masa magra y esto es importante porque diferentes enfermedades por supuesto entre ellas enfermedades cardiovasculares y neurológicas donde el problema es el descenso de la masa magra y no tanto el cambio de la masa adiposa, el Lean Wright Index o el índice de masa magra que nosotros diseñamos en 2011 mide o estima de manera indirecta la cantidad de masa magra principalmente el músculo, pero no es el único tejido magro que hay en el cuerpo y el índice de masa abdominal que lo que nos indica indirectamente es la adiposidad sobre todo la central, estos índices han sido derivados en sujetos sanos y los hemos probado en mexicanos y latinoamericanos en diferentes contextos sobre todo en infarto cerebral, infarto del miocardio y algunos que tienen riesgo cardiovascular mayor.

Por ejemplo aquí podemos ver que el área bajo la curva para la ..... Es muy similar al índice cintura talla pero el único índice que se separa que es completamente distinto de todos los demás para predecir masa magra es el Lean Wey Index el único que realmente puede predecir eso y no hay ningún otro que sepamos que este publicado que solo necesite circunferencia de cintura, peso y talla algunos de ellos han sido derivado por ejemplo con densitometría pero este es el único hasta donde sabemos que solo necesita índices antropométricos muy fácilmente de calcular.

A un años en Mexicanos con infarto cerebral las personas que tienen un índice de masa magra menor a 40 tienen menores probabilidades de subsistencia o tienen mayores probabilidades de que ocurra una muerte hospitalización o un nuevo infarto cerebral aun ajustando por variables de peso como son la edad o la escala de los Institutos Nacionales de salud de los estados unidos que es una escala de severidad del infarto cerebral, en latinoamericanos se ve aquí la mayor probabilidad de muerte ocurre en las personas con un índice de masa magra menor a 40 y vean como ustedes conforme más una masa magra hay menos probabilidades de muerte hay a 4 años lo mismo aquí para el caso de una mayor probabilidad de muerte, infarto al miocardio o nuevo infarto cerebral, este índice de distribución de la grasa corporal lo publicamos en español y así es como se calcula y lo que predice es grasa corporal mejor que el IMC, el índice de cintura cadera o la circunferencia de cintura y nos correlaciona bastante bien con la cantidad de grasa intrabdominal como podemos ver aquí con el área bajo la curva para la predicción de personas con más de un 20% de grasa corporal o bien con un perímetro abdominal nocivo lo que estamos haciendo ahora es una relación de estos índices con marcadores bioquímicos tradicionales de riesgo en enfermedad cardiovascular, predicción de diabetes y eventos cardiovasculares en pacientes en riesgo y en población general, predicción de diabetes en sujetos en riesgo y desempeño de estos índices en individuos con la encestaría amerindia que por supuesto es una preocupación muchas gracias.



---

## **Regulación de la actividad de la cinasa WNK4 productora de hipertensión arterial**

**Ponente: Dra. María Castañeda Bueno**

**Simposio:** Nuevos valores e investigación en el INCMNSZ

**Coordinador: Dr. Gerardo Gamba Ayala**

**Sesión:** Sesión Conjunta con el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

**Sede:** Auditorio de la Academia Nacional de Medicina

La Dra. Castañeda agradece la oportunidad de venir a platicarles sobre la investigación que se está realizando en la Unidad de Fisiología renal molecular.

Mi presentación se titula regulación de la actividad de la cinasa WNK4 productora de la hipertensión arterial.

Quiero empezar hablando de quien es WINK4 y por qué estudiamos su relación con la presión arterial, WNK4 es una cinasa que se expresa en varios tejido y el riñón es uno de los órganos en que la expresión es más abundante su relación con la presión arterial se empezó a estudiar ya hace más de 10 años a partir de que el grupo del Dr. Richard Lifton en la universidad de Jan describió que mutaciones es el gran gen que codifica para esta cinasa son causantes de un síndrome llamado pseudohipoaldosteronismo tipo II o PHA22 en el cual los pacientes presentan entre otras muchas alteraciones hipertensión arterial, además se describió que las mutaciones PHA2 en WNK4 ocurren un una región muy específica de la cinasa a la cual llamamos el dominio acidico debido a la alta densidad de aminoácidos con carga negativa presentes en esta zona de la proteína.

Hoy en día sabemos que el dominio ácido de WNK4 es importante para la infracción o es el sitio de interacción con otra proteína que se llama KELLS3 que forma parte de un complejo que está representado en esta caricatura que tiene actividad “euriquiligasa” en condiciones normales el complejo promueve la degradación de WNK4 regulando así los niveles de expresión de la cinasa, sin embargo en pacientes con PHA2 las mutaciones en WNK4 impiden la interacción con el complejo lo que disminuye la taza de degradación de la cinasa y esto a su vez promueve sobre expresión de WNK4.



Sabemos también que una de las consecuencias más importantes de la sobre expresión de WNK4 es la sobre activación del NCC que es el cotransportador de sodio y cloruro sensible a tiazidas que se expresa de manera específica en la membrana apical de este pequeño segmento de la nefrona que conocemos como tubo contorneado distal, la sobre activación de NCC es en gran parte responsable de las alteraciones observadas en el PHA2 y evidencias claras de esto son por ejemplo que la inactivación genética del NCC en humanos produce un síndrome llamado síndrome de Guitelmal que es la imagen en espejo de PHA2, es decir en el PHA2 que se produce por que el NCC no funciona se observa exactamente lo opuesto a lo observado en el PHA2, la segunda es que los pacientes con PHA2 presentan alta sensibilidad al tratamiento con tiazidas y no solo la hipertensión se corrige si no también todas las demás alteraciones observadas y por último que en ratones PHA2 la actividad de NCC esta aumentada y la inhibición de esta actividad revierte el fenotipo, ahora por que la sobre expresión de WNK4 resuelta en la sobre activación del NCC, esto es porque WNK4 es parte de una vía de señalización intracelular implicada en la regulación fisiológica de la actividad del NCC y las mutaciones PHA2 alteran el funcionamiento de esta vía WNK4 no regula de manera directa al cotransportador si no que WNK4 se une y fosforila a la cinasa SPAK y OSR1 que a su vez son los responsables de unirse y desfosforilar a NCC en el extremo mino terminal y esta fosforilación del transportador se traduce en su activación de tal forma que en el PHA2 en que la expresión de WNK4 esta aumentada esta vía está más activa y por lo tanto se observa un nivel basal de actividad del NCC mayor, la actividad del NCC se regula por ejemplo ante cambios en el volumen circulante hay cambios en ingesta de cloruro de sodio que son situaciones en las que se requiere ajustar el nivel de excreción urinaria de sal, una de las maneras en las que el cuerpo logra esto es a través de las acciones del sistema..... por ejemplo sabemos que la angiotensina II promueve la fosforilación amino terminal y la transaclación del NCC a la membrana pical y de esta manera promueve su actividad, además sabemos que la cinasa WNK4 juega un papel clave en la regulación de NCC por angiotensina II y esto lo demostramos en este artículo que publicamos con Investigación realizado durante mi trabajo de doctorado en el laboratorio del Dr. Gamba en el que observamos que en ratones silvestres se observa un aumento en la fosforilación amino terminal del NCC y un aumento en la fosforilación de SPAK ante la infusión de angiotensina II, mientras que en ratones carentes de la cinasa WNK4 el aumenta en la fosforilación de estas dos proteínas ante la infusión de angiotensina II no se produce.

Lo que voy a presentar a partir de este momento es parte de los resultados que obtuve durante mi estancia pos-doctoral en el laboratorio del Dr. Lifston y además es parte de un trabajo que estábamos continuando en el laboratorio lo que nos propusimos fue estudiar con más detalle los mecanismos de señalización intracelular mediante los cuales la angiotensina II modula la actividad del NCC a través de la cinasa WNK4, para esto partimos del conocimiento de que la angiotensina II regula la reabsorción renal de sodio a través de la activación de los



receptores de tipo AT1 en las células del epitelio renal y la activación del receptor AT1 activa los mecanismos clásicos de señalización intracelular de un receptor acoplados a proteína que involucra la activación de proteína lipasa C que a su vez se traduce en el aumento en la producción de ..... El aumento en la concentración de calcio intracelular y la activación de la proteína AC que es la principal efectora de las respuestas celulares por lo tanto nos planteamos la hipótesis de que WNK4 fuera directamente un sustrato de fosforilación por PKC , de esta hipótesis encontramos en la secuencia de WNK4 cinco motivos que cumplen con la secuencia consenso para la fosforilación por PKC esto es la secuencia RRXCC y lo que se muestra es la localización de estos cinco motivos como se puede ver don de ellos se localizan en el extremos mino terminal de la proteína antes del dominio cinasa y los tres restantes se localizan en el cargo oxiterminal muy cerca de otros motivos funcionales importantes, ahora como acercamiento inicial decidimos transfretar a células JEK y Q7 con WNK4 y estimulamos estas células con inhibidor específico de PKC BIM o con un activador de PKC un esterdeforgol indicado aquí como TPA de los extractos proteína de estas células realizamos “westembloks” para medir el grado de fosforilación de WNK4 utilizando un anticuerpo que reconoce de manera específica a hepitopes RRXCC fosforilados y lo que observamos fue que ante la activación de PKC se produjo un aumento en la fosforilación de WNK4 el cual se previno en presencia del inhibidor de PKC por lo tanto concluimos que la activación de PKC en células en cultivo promueve la fosforilación de WNK4 en motivos RRXCC realizamos también ensayos inasimvitro en lo que coincubamos a las proteínas recominantes puras alfa PKC y WNK4 y lo que observamos fue que en presencia de PKC la fosforilación de WNK4 en motivos RRXCC aumentó lo cual sugiere fuertemente que WNK4 es un sustrato directo para la fosforilación por PKC lo cual sugiere fuertemente que WNK4 es un sustrato directo para fosforilación por PKC además incubamos células de angiotensina II y medimos el grado de fosforilacion de WNK4 y observamos que se produjo un aumento en la fosforilación de WNK4 similar al observado con el activador de PKC y este aumento se previno en presencia del inhibidor de PKC por lo que concluimos que en células el cultivo la angiotensina II tiene la capacidad de estimular la fosforilación de WNK4 y que este efecto es dependiente de la activación de PKC con la finalidad de determinar cuáles de estos motivos RRXCC son efectivamente sitios de fosforilación realizamos ensayos de espectrometría de masas para la identificación de péptidos fosforilados y de esta manera logramos observar que al menos cuatro de los cinco motivos RRXCC efectivamente se fosforila, generamos entonces fosfo anticuerpos sitio específicos y después de realizar los ensayos necesarios para demostrar la especificidad de estos anticuerpos los utilizamos para estudiar la dinámica de fosforilación de cada uno de estos sitios ante la estimulación con angiotensina II o ante la activación de PKC con el esteforgol y bueno lo que encontramos es que la fosforilación de los cinco sitios RRXCC aumenta ante cualquiera de estas dos maniobras, los siguiente que nos propusimos fue el estudiar el impacto de la fosforilación de estos sitios sobre la función de WNK4 sobre la función de la cinasa como indicador del nivel de actividad de WNK4 decidimos estudiar o medir el nivel



de fosforilación de unos sustratos mejor conocidos que es la cinasa SPAK, se observa que la fosforilación de SPAK aumento ante la estimulación con angiotensina II en células transfectadas con WNK4 silvestre, sin embargo en células transfectadas con una mutante se WNK4 carente de los cinco sitios de fosforilación, este aumento la fosforilación de SPAK ante la incubación con angiotensina II no se observó lo cual sugiere que la fosforilación de al menos uno de los cinco sitios RRXCC está íntimamente relacionado con el grado de actividad de WNK4 con la finalidad de determinar cuál de estos sitios es el que está implicado en la regulación de la actividad de WNK4 en celular tranfectadas con angiotensina II en células transfectadas con WNK4 y estimulada con angiotensina II y observamos que el nivel de actividad de WNK4 disminuyó de manera muy importante con la mutación S64A y con la mutación S1169, 1196<sup>a</sup> y que casi prácticamente se abatió por completo en presencia de ambas mutaciones por lo que concluimos que la serina 64 y la 1196 son dos sitios cuya fosforilación es más relevante para la actividad de WNK4 finalmente decidimos estudiar la relevancia o con el fin de evaluar la relevancia fisiológica de esta fosforilación de WNK4 realizamos experimentos en ratones a los que sometimos a dieta baja en sodio y a tratamiento agudo con furosemida para lograr la activación del sistema renagiotensina y lo que observamos fue que en estos ratones se produjo un aumento en la fosforilación de la cinasa 64 y la serina 1196 que se acompañó del aumento esperado en la fosforilación del NCC y por último con la finalidad de estudiar en que segmentos de la nefrona se produjeron estos cambios realizamos inmunoflorescencia en las que observamos que se produjo un aumento por ejemplo en la fosforilación de la serina 64 específicamente en células o en túbulos que también son positivos para NCC es decir este aumento se produjo en el túbulo distal lo cual va de acuerdo con la hipótesis de que este es un mecanismo importante para la regulación del NCC por angiotensina II y ya para concluir el modelo que proponemos en base en estos datos es que la estimulación del NCC por angiotensina II se debe a la activación de receptores de tipo AT1 en las células del túbulo contorneado distal y que al disociarse la proteína GalfaQ se produce la activación de la proteína PKC a través de los mecanismos clásicos de señalización, la proteína encinasa C fosforila a WNK4 en residuos que son muy importantes para su actividad que es la serina 64 y la serina 1196 y al activarse WNK4 promueve la activación de ..... que a su vez fosforilan al NCC y lo activan y finalmente quiero agradecer a todos los miembro de la unidad de fisiología renal del Instituto y en particular al Dr. Gamba que ha sido bimentor desde ya hace muchos años. Muchas gracias.





---

## **Discusión y conclusiones**

**Ponente: Dr. Gerardo Gamba Ayala**

**Simposio:** Nuevos valores e investigación en el INCMNSZ

**Coordinador: Dr. Gerardo Gamba Ayala**

**Sesión:** Sesión Conjunta con el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

**Sede:** Auditorio de la Academia Nacional de Medicina

El Dr. Salamanca comenta que sólo una presentación de este nivel nos estimula para hacer una reflexión acerca de cuál es nuestro nivel en la competitividad internacional, he estado reflexionando a lo largo de las presentaciones y quiero felicitar al Dr. Gerardo Gamba por una excelente sesión que hemos disfrutado y me parece muy importante llamar la atención acerca de la presentación que nos hizo el Dr. Alfredo Ulloa porque la mayoría de ustedes lo identifica como un investigador del Instituto Nacional de Nutrición y aquí está David su director ex presidente de la Academia pero tienen que saber que también fue distinguido investigador del Instituto Mexicano del Seguro Social y que tuvo un apoyo para el desarrollo de su línea de Investigación y ahora nos presenta un programa muy ambicioso que permite ofrecer una serie de redes con algunas Instituciones pero me parece que para este momento el esfuerzo debe incluir a todas las Instituciones del sector salud y las interesadas en desarrollar la Investigación y en este campo en el país y déjenme hacer una memoria muy rápida de esto, con investigadores del Instituto Nacional de la Nutrición, expresidente de la Academia también Rubén Liscar, Salvador Armendáriz, desafortunadamente ya fallecido organizamos el primer simposio que se hizo en Latinoamérica con el patrocinio de esta Academia sobre el proyecto del genoma humano del que estamos celebrando justamente a nivel internacional un cuarto de siglo 25 años y se hizo en el centro de Oaxtepec del Instituto Mexicano del Seguro Social que fue nuestro anfitrión, fue muy exitoso vinieron investigadores de frontera en ese momento y lo que quiero ahora poner 25 años después es que estamos compitiendo con un proyecto ya no solo circunscrito a Estados Unidos en donde el presidente Obama dijo y tiene el apoyo y nombro a quien está a cargo del desarrollo del proyecto la medicina de precisión y nombró a Francis Collins al frente de él, él remplazó a Watson en la jefatura de este proyecto y lo que pretenden en Estados Unidos es hacer la secuenciación de un millón de sujetos de la Unión Americana como competimos nosotros como país y ahora por este ámbito de la Academia que tiene que tener algo que decir enfrente de esto y que no es solo en Estados Unidos, ya China se apuntó y se apuntó Japón, etc. Por



qué no ampliamos esta visión para hacer un programa integrativo que nos una a todos como pretendimos entonces 4 años antes de que Brasil, porque nosotros hicimos la propuesta, hiciera un proyecto para hacer la secuenciación de su parásito fastidioso que acababa sus cultivos y acabaron haciendo centros nacionales, siete de ellos que culminaron con una secuenciación muy exitosa entonces que les permitió desarrollar muchas líneas de Investigación al futuro, porque ahora si estamos en una oportunidad tan especial, está aquí la Dra. Patricia en donde las unidades de investigación de los Institutos han sido muy exitosos, está la Universidad, está la Academia Nacional de Medicina, porque no reflexionar acerca de hacer un proyecto conjunto que de veras compita internacionalmente pero a muy buen nivel, les voy a enseñar respuestas muy parciales que ya no tienen la trascendencia que tuvieron previamente, me parece importante reflexionar cuando se acaba de sacar un número de ..... que justamente en la portada que tiene la medicina de precisión y que lleva una consideración internacional en donde no podemos quedar marginados de un desarrollo como este y que siento que es una oportunidad gracias a que se ha planteado aquí la posibilidad de que se haga un desarrollo verdaderamente competitivo, celebro mucho la sesión pero quiero dejar estos puntos de reflexión no para el futuro lejano sino para el futuro inmediato.

El Dr. Ulloa toma la palabra, efectivamente estamos entrando muy tarde a la alta tecnología y digo muy tarde porque yo mencionaba muy orgullosamente que hay nada más 3 "HISEQ" 2500 EN México cuando en otros lugares hay 100, en otros países hay 100 o más en el caso de China o en ciudades como los ángeles en donde tienen la calidad de secuenciación de nueva generación el punto es que siempre ha costado mucho trabajo Fabio, ese brincó a la alta tecnología por lo que la inversión requiere es esto y no solo la inversión en cuanto al equipo si no la inversión en cuanto a su mantenimiento y demás que aproximadamente es un 10% de la inversión en el equipo que era una cantidad pues bastante importante, nosotros requerimos 14 millones anuales solo para mantenimiento del equipo, entonces esta idea que es muy innovadora para nuestro medio es como un experimento, vamos a ver cómo funciona esta red pero no solo para promover estos servicios de alta tecnología sino también para promover la interacción entre investigadores que pertenezcan al consorcio y si este proyecto tiene éxito yo contemplo el que no exista una red de apoyo a la investigación si ni que existan 50 redes de apoyo a la Investigación dentro del país que permitan precisamente dar ese brinco a la alta tecnología, hay proyectos extraordinariamente buenos no solo en los institutos nacionales de salud, en los institutos que pertenecen al subsistema de la coordinación de la Investigación científica sino también en el Instituto Mexicano del Seguro Social tuvo la oportunidad de trabajar muchísimo en la coordinación durante 12 años y realmente en proyectos grandes, lo que necesitamos es tener esa valentía de invertir de jugarnos el riesgo de invertir en alta tecnología y que los investigadores también sepan cómo hacer un buen uso de esa tecnología para hacer investigación realmente de alta calidad.



Felicitaciones por el contenido de las pláticas de esta noche, yo quisiera preguntar si se estudió algo relativo a té verde o esta mencionado en compuestos activos supongo que así como están mencionados pues debe haber alguna situación interesante respecto a tumores o malformaciones como divertículos, y la otra sería la grasa parda, se le puso atención hace algunos tres años también se tiene algún comentario de la grasa parda.

La Dra. Noriega toma el micrófono y contesta, el té verde es rico en antioxidante y bueno se ha visto que muchas de las alteraciones que se dan durante la obesidad e incluso se debe también a un aumento de las especies reactivas del sistema, entonces el dar este tipo de bebidas ricas en antioxidante pues mejora o previene el daño que se genera por las especies reactivas de oxígeno.

El Dr. Chiquete comenta que desde el punto de vista metabólico tenemos tres tipos de tejido adiposo, el blanco, el beige y el pardo, la grasa parda realmente es prácticamente inexistente en el adulto, la grasa beige es probablemente un poquito más frecuente, sin embargo los índices antropométricos tal como se definen actualmente en realidad no ayudan a estimar la proporción de esa grasa, entonces mucho de lo que estimamos con estos índices pues asumimos que es el tejido adiposo nocivo y no tanto el metabólicamente más activo y que ayuda a la pérdida de peso como es la grasa beige y la parda desafortunadamente.

Sr. Vicepresidente: creo que hemos participado en una sesión extraordinaria en donde han desfilado una gama de talentos desde el trabajo de ingreso del Dr. Ponce de León pasando por el Dr. Efrén Ulloa que para mí es un investigador extraordinario ya que el reúne los dos extremos de conocimiento humano que van desde las verdaderas ciencias hasta las bellas artes y tiene este tacto tan especial hasta de lo que se presentó aquí en relación al sistema nervioso central lo que se presentó hipertensión arterial sistémica, riñón, hablando de gentes que han estado o han sido apoyadas por líderes de la investigación como Gerardo Gamba, como Armando Tovar, como Guillermo García Ramos, todos ellos dirigidos por su director por David Carsenobish, nos han traído una sesión que ha sublimado al espíritu, nada más una palabra con relación a la sesión en donde yo quisiera mencionarle a José Carlos Crispín la importancia de las proteínas fosfatasas que son tres grupos muy específicos y en los que yo más que pensar en las interrupciones pensaría en cuantas de calcio que están entrando o están saliendo de la célula y que están regulando al inhibidor de proteco 2 que es el que permite o no los mecanismos de autofosforilación que facilita o no los procesos de autofosforilación no solamente para el sistema inmunológico sino para prácticamente todas las células del organismo incluyendo el sistema nervioso central, la actividad de estas proteínas fosfatasas depende más que de otra cosa del flujo iónico de calcio y de la magnitud de este influjo. Por otro lado solo mencionar y este es un recado para Armando Tovar la capacidad que tiene la circutina I para inhibir la transcripción aunque facilita la expresión de promotor de pipiaralfasi, cuál sería la repercusión a nivel lipídico en



---

un momento dado y preguntar también a la Dra. Castañeda, dejar una idea en relación a que es lo que pasa con los mecanismos de fosforilación de la WNK4 realmente esta proteína presenta mecanismos de autofosforilación o no y si es la proteína encinaza tipo C la que le está activando, que no intervendría a través del mecanismo de convergencia y divergencia también la proteína encinaza tipo II, son preguntas que me surgen, son trabajos muy interesantes, son trabajos que muestran el talento de las gentes que conforman un Instituto extraordinario, gracias y felicidades.

**\*El texto de esta ponencia se encuentra disponible en la página de la ANM**